Biological assay

في البدايه

ليه اتسمت ب Biological assays

عشان بنتعلم فيها ازاي نعرف تركيز ماده مجهولة التركيز (unknown) بطريقة غير chemical assays زي اللي خدناها في التحليليه في منهج العملي زي titration

و دا عن طريق قياس تاثير الماده دى على الحيوانات او الانسجة المفصولة منها و مقارنتها ب standardكون عارفين تركيزة.

للتوضيح

مثلا عندي دوا معين بيعالج مرض معين بعمل التجربه بتاعتي عشان اوصف تاثيره علي جزء من نسيج او عضو بفصله من حيوان freshly killed

يعني مش شغال علي كل الحيوان لا بجيب منه الجزء اللي عايز اشتغل عليه بس

طب نفرق اول بين اساسيات في التجارب اللي بنعملها علي الحيوانات في عندي حاجه اسمها

Invivo هنا التجربه علي whole animal مفيش فصل جزء لا كله

Invitro يعني التجربه بعملها علي جزء من الحيوان ايا كان نسيج او عضو بفصله من جسمه وابدا شغلي

هل اما اجيب الـ animal وافصل منه ال tissue or organ هيفضل عايش بعد الفصل ؟!!

طب ازاي تجربه هتم اساسا لو هو ميت ؟!!

يبقي لازم اوفر الظروف اللي كانت موجوده ليه جوه الحيوان او ظروف مشابه ليها مناسبه انه يفضل عايش

مثلا زي درجه الحراره كل حيوان ليه حراره ووسط يناسبه مثلا الضفادع غير الفئران يعني frog 25 Rat 37 لان الضفادع ذوات دم بارد عندك برده PH و isotonicity يعني التركيز جوه زي بره يعني لو جبت خليه حطتها في hypotonic soln الـ fluid هيدخل جواها وهتنتفخ والعكس صحيح لو كان hypertonic soln هتنكمش وهتفقد خواصها عشان كده اما نتكلم عن الجهاز هتعرف اهميه ال NaCl

هنضع الجزء المفصول في suitable physiological solution

عن طريق جهاز بنستخدمه ده اساس شغلي اسمه physiograph /kymograph

الجهاز ده بيعمل recording the response of tissue and physiological characters

اللي هي زي

Contraction relaxation blood pressure respiratory capacity respiratory volume

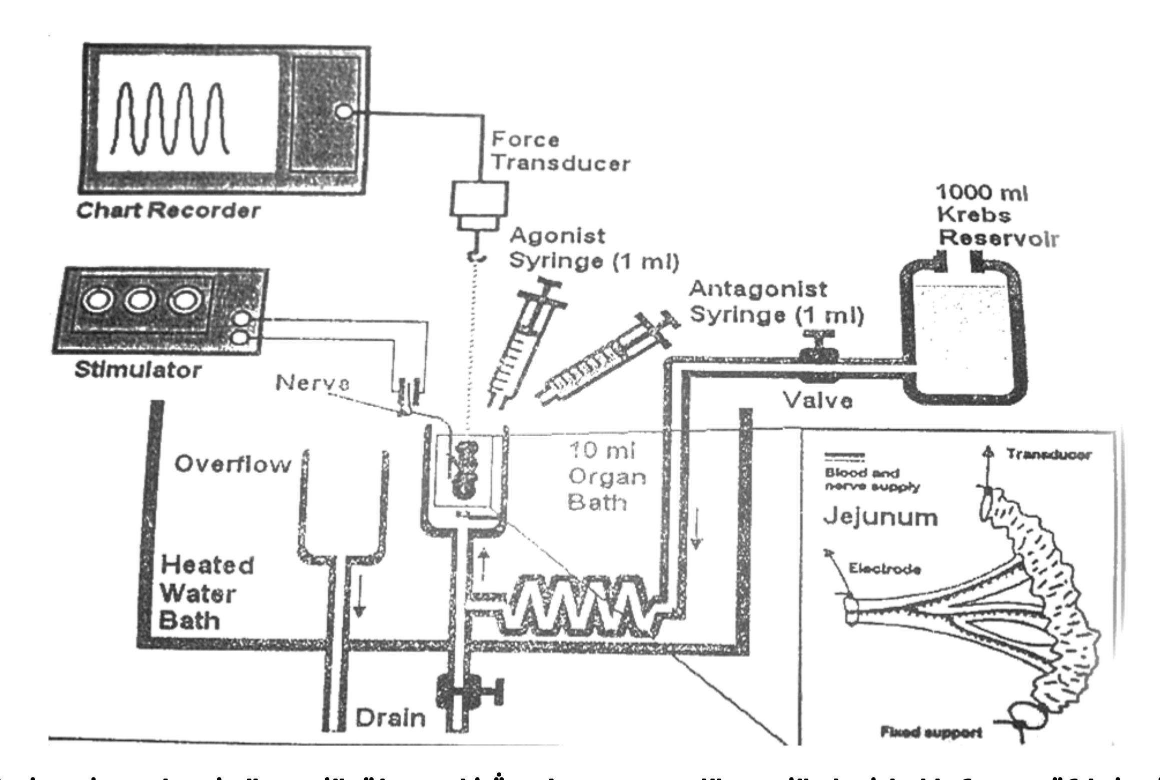
بينتج من الجهاز ده رسم

chart is known as kymogram /chart

دي كانت مقدمه للسكشن نبدا ندرس الجهاز بشكل واضح



في البدايه لو قالو نشتغل عليه هنشتغل عليه يعني لازم تكون عارف مكوناته وشغله في البدايه زي ما عرفنا اخدر ال حيوان التخدير بيختلف حسب جرعته والحيوان



هنعرف اكتر بعد كدا ابدا فصل النسيج اللي هدرس عليه شغلي هعلق النسيج المفصول ده في جزء اسمه Organ Bath

WATER BATH جواه الجزء اللي فات فايدته انه بيضبط درجه الحراره حسب الحيوان اللي فصلت منه الجزء واشتغلت عليه قبل كده كنت بخلط ميه مغليه بميه بارده واضبط درجه الحراره حسب الترمومتر

النسيج بتاعي متوصل ب reservoir contain physiological salt solution

هيملي ال organ bath عشان نوفر ظروف مناسبه لحياته وعشان يمد ليه كل ال nutrients

مكوناته بتختلف حسب نوع النسيج المفصول لكن في ثوابت برده بيتكون منها بتشترك فيها كلهم وتختلف في حاجات تانيه تميز انواعها

Physiological Salt Solutions بتختلف حسب نسب الثوابت دي اللي بتختلف حسب احتياجات النسيج ونوعه

الثوابت هي :

1. NaCl To Adjust Isotonicity
2. HCO_3 Buffer Control PH
3. Mg For Muscle Relaxation
4. Ca For Muscle Contraction
5. Nutrients



خلي بالك Ca Mg دايما عكس بعض يعني لو حد عنده نقص Ca عنده زياده Mg وبالتالي مشكله في Relaxation فدايما يبقي عنده تقلصات عضليه Cramps والعكس صح يعني زياده كالسيوم نقص ماغنسيوم يحصل خلل Contraction

سريعا كده عندي نوعين مختلفين من ال Muscle

1. Smooth Out Of Control
2. Skeletal Under Control

زي ال مش بتتحكم في Contraction بتاعها

Tissue Preparation	Physiological Solution
Amphibian tissue (e.g. Rectus abdominis muscle of the frog)	Ringer solution
Rabbit intestine	Tyrode's solution
Heart muscle (e.g. Isolated rabbit heart)	Ringer-Locke solution
Isolated rat uterus	De Jalon's solution
Isolated rabbit atrium	Krebs-Hensleit solution
Mammalian skeletal muscle (e.g. Guinea pig tracheal chain)	Krebs solution
Cat spleen	McEwen's solution

Aeration لازم النسيج يكون متصل اتصال مستمر بال O_2

Aeration Rate لازم اتحكم فيه مش قليل اوي وبالتالي الاوكسجين يقل تموت الخليه ولا كبيره اوي فيحصل Damage To Tissue

التهويه دي بتتم في شكل Fine Stream Of Bubbles

بيتم بشكل من اتنين اما Pure O_2

95% O_2 , 5%CO_2

<u>فايده التهويه دي حاجتين</u>

1. بتوصل ال O_2 للنسيج
2. بيعمل Mix لل Drug With Solution

لان المفروض اعمل Application To Drug بتاعي فعايزه يبقي متوزع مش في مكان مركز والتاني مخفف تركيز متساوي وبالتالي بالتهويه دي قدرت اوفر وقت انتشار الدوا ودوبانه ووصوله للنسيج

زي ما عارف ان HCO_3 مكون اساسي ك Buffer طب فايدته ايه بص معايا هيتحول ل OH في وجود CO_2 اللي هيدي H_2O لما ياخد H^+ من المحلول



نسبه ال HCO_3 في المحلول بتختلف عشان كده لازم كل نسيج اضبط النسبه بتاعته طب هي كده اختلفت وانا عايزها ثابته اعمل ايه ؟؟!!!

هحط CO_2 ومن هنا ال C هيكون مع $H_2O \rightarrow HCO_3$

ومن هنا تركيزه فضل ثابت يبقي عملت Maintain Buffer Conc

بعد كده من ضمن مكونات الجهاز ومهم جدا عندي Recording Device

ده زي ما قلنا بيسجل الـ Response Of Tissue اللي هيخرج في شكل Chart

ممكن يكون حاجه من اتنين

1- Transducers

في رسمه الجهاز هنلاحظ انه مربوط بخطاف Hock من فوق ده زي Parameter بيحس باي حركه Mechanical Movement بتحصل زي مثلا Contraction/ Relaxation لـ Muscle يبدا يحولها لـ Electrical Signal

هو متصل ب Chart Recorder ده جهاز بيسجل ال اشارات اللي نتجت كرسم Chart/Gram من خلال برنامج الدكاتره اتلكمو عنه في السكاشن

في 3 انواع عندنا ليه بتعتمد علي متغيرين واحد منهم بيبقي ثابت والتاني بيتغير هما Tension And Length

مقطع Iso معناه ثابت

الانواع هي

1. isometric transducer

ده بيقيس التغير في جهد العضله muscle tension لما يكون طول العضله ثابت العضله اللي ممكن ندرس عليها هنا زي اللي موجوده في القلب

2. isotonic transducer

بيقيس التغير في طول العضله لما يكون جهد العضله muscle tension ثابت زي عضلات ال rabbit intestine

3. pressure transducer

بيقيس التغير في pressure as in heart and blood vessels

2- Horizontal lever

بيكون احد نهايتيه متصل ب النسيج المفصول

النهايه التانيه بتكون متصله بدعامه مثبته في الـ organ bath

بيرسم contraction او التغير اللي بيحصل من خلال rotating drum

عشان نفهم اكتر هنضرب مثال

مثلا عملت انقباض للعضله عن طريق agonist such as acetylcholine

العضله حصلها انقباض يعني قصرت طبعا زي ما قلنا انها متثبته من الطرفين ب hocks

هيحصل شد لطرف من طرفين ال lever لاسفل اللي متصل ب ال muscle



النهايه التانيه ل lever هتتحرك لاعلي وبالطريقه دي الانقباض اتسجل علي الاسطوانه المتحركه rotating drum

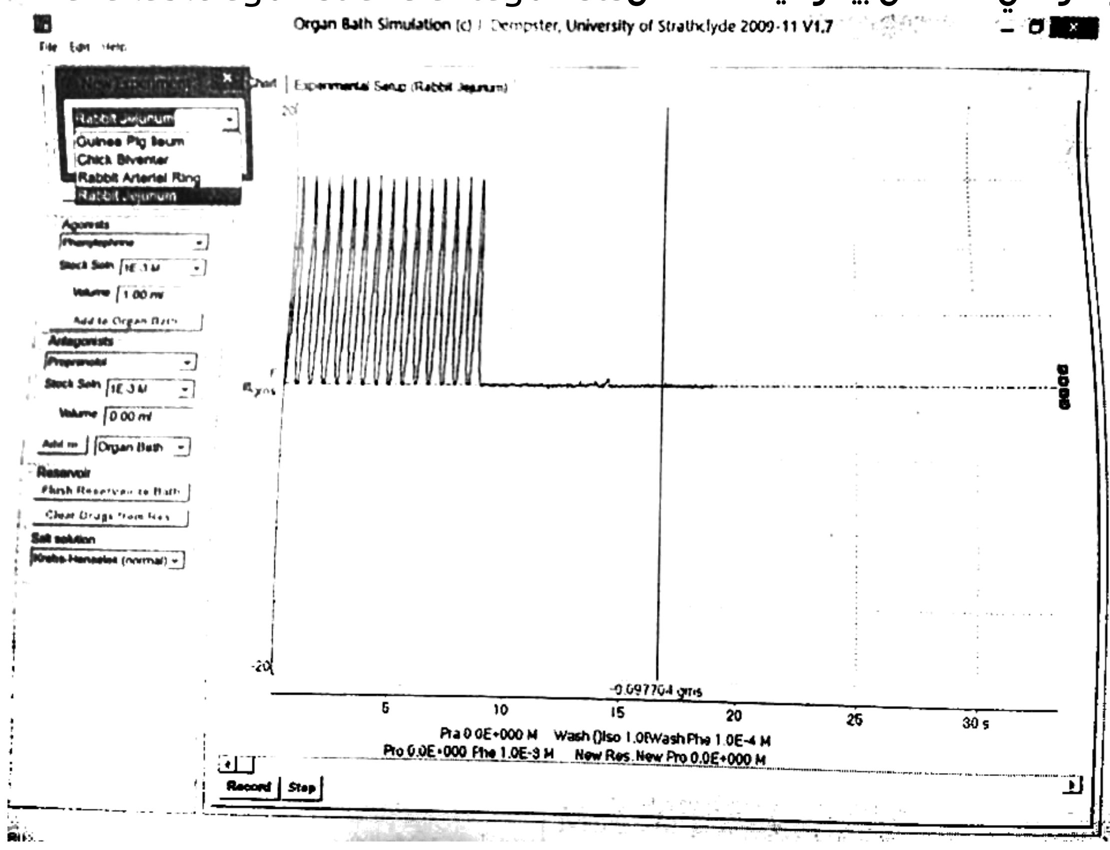
اسم البرنامج في شريط العنوان Organ bath simulation

زي ما هو واضح عشان نعمل تجربه جديده لازم شويه خطوات

1- نختار نوع النسيج اللي هنحطه في organ bath من قائمه الtissue type list

2- اضغط علي new experiment button

3- اختار الدوا اللي هنشتغل بيه وضيفه لقائمه الavailable agonist and antagonists



في النهايه هنتكلم عن الظروف اللي لازم نوفرها عشان نحصل علي نتائج دقيقه وتحضيره صحيحه

1- Handling of tissue التعامل مع النسيج اللي فصلناه لازم يكون بحرص بدون اي stretching or pressing them

2- Physiological salt solutions اتكلمنا عنها بالتفصيل

3- Aeration

4- Temperature لازم نوفر درجه حراره مناسبه ثابته طول التجربه مثلا لو كنت بتتعامل مع Amphibians(cold blooded animals) بتقدر انها تعيش لفترات طويله في درجه حراره الغرفه 25 C

اما بالنسبه لـ mammalian tissue فانها بتحتاج انك تضبط درجه الحراره عند 37 C

وفي تحضيرات تانيه بتحتاج درجات حراره معيه زي مثلا ال isolated rat uterus بتحتاج درجه حراه من 30 ل31

5- Volume of bathلازم يفضل ثابت طول التجربه لان اي تغير في الحجم ممكن ياثر علي تخفيف وتغيير حجم الدوا المضاف

6- Addition of drug تجنب اضافه كميات كبيره من الدوا لان ده ممكن يؤدي الي نزول في درجه حراره ال bath اللي اصلا استخدمته عشان اضبط درجه الحراره وكمان هيعمل تغيير في تركيز المحلول

7- Contact time الوقت المسموح للدوا عشان يشتغل ويدي تاثيره لازم يكون ثابت في كل اضافه دوا الوقت ده بيختلف من تحضيره للتانيه حسب سرعه استجابه الجزء اللي شغال عليه سواء نسيج او عضو

8- Recording deviceيكون مناسب عشان يسجل الاستجابه ويسجل الرسم chart بشكل واضح

9- Washingهنعملها بطريقه من 3 اما ب سحب او اعاده ملئ او overflow الfluid يعني نفضل نضيف لغايه اما القديم يزال تماما

في شويه احتياطات اثناء التجربه علي النسيج المفصول

لازم كل الاجهزه يتم فحصها من اجل ظروف افضل للشغل يعني مثلا ال organ bathلازم يكون

cleaned ,filled with physiological salt soln ,bubbled with air maintained at desired temperature

Lever should be adjusted

الـ drum تحركه يبدا بابطء سرعه ممكنه وفي وقت الـ washingالـ drumيتوقف عن الحركه

لو الـ contact timeبين الـ agonist and receptorزاد ده ممكن يؤدي الي ان ال receptorيبقي اقل حساسيه لل agonist او يفقد حساسيته ليه

لازي تراعي ان العضله ذات نفسها بيكون ليها انقباض ذاتي غير اللي ممكن ينتج عن الدوا بسميه myogenic contractionده انقباض طبيعي

ارتفاع ال contraction بسميه amplitude



